

# **BIOLOGIA MOLECOLARE**

## *Insegnamento di Biologia Molecolare*

<b>Codice Disciplina:</b> BT071 <b>Codice Insegnamento:</b> BT022	<b>Settore:</b> BIO/11	<b>N° CFU:</b> 5
<b>Docente:</b> Pelicci Giuliana	<b>Ore :</b> 40	<b>Corso di Laurea :</b> Biotechnologie <b>Anno :</b> II <b>Semestre :</b> I

### **Obiettivo del modulo**

Fornire le conoscenze di base della biologia molecolare principalmente negli organismi eucarioti , con particolare riferimento al settore bio-medico, le loro prospettive di ricerca e la comprensione dei principali processi cellulari.

### **Conoscenze ed abilità attese**

Lo studente deve conoscere i meccanismi molecolari e cellulari che regolano la replicazione, la crescita cellulare e il programma di espressione genica sia in organismi procarioti che eucarioti.

### **Programma del corso**

#### **Programma**

- Introduzione alla biologia molecolare: la nascita della Biologia Molecolare, dalla scoperta del DNA alla dimostrazione del suo ruolo come materiale genetico.  
Struttura chimica e fisica del DNA. Le basi genomiche della complessità: il ruolo del controllo dell'espressione genica, cenni di genomica comparata

#### ***Basi molecolari dell'epigenetica: struttura e regolazione della cromatina***

- struttura dei nucleosomi organizzazione della cromatina
- Gli istoni e le loro modificazioni (acetilazione, metilazione, fosforilazione).
- Meccanismi del rimodellamento istonico e delle modificazioni della cromatina e loro ruolo nella regolazione dell'espressione genica. Bromodomini e cromodomini. Ruolo e esempi di enzimi modificatori istonici: istone acetil transferasi (HAT), istone deacetilasi. Complessi di rimodellamento istonico.
- Ruolo e meccanismi degli elementi isolatori.
- Metilazione del DNA: significato biologico, DNA metil-transferasi de novo e di mantenimento, meccanismi mediante cui la metilazione del DNA regola l'espressione genica: domini MeCP2.
- Regolazione, funzione e significato biologico dei complessi Polycomb e Trithorax, e delle loro attività metil-transferasi e demetilasi.

#### ***Regolazione della trascrizione***

- cenni sulle differenze fra la trascrizione dei procarioti e degli eucarioti
- Trascrizione e regolazione negli eucarioti: RNA polimerasi II, struttura del promotore, fattori basali di Pol II e assemblaggio del complesso di inizio. Ruolo del Mediatore.
- Meccanismi di riconoscimento dei siti di avvio della trascrizione: TATA box e formazione dei complessi di avvio della trascrizione.
- Ruolo delle sequenze regolatrici della trascrizione e i fattori che regolano la trascrizione (fattori di trascrizione e loro organizzazione modulare e dimerica).
- Ruolo delle interazioni fra i fattori di trascrizione e i complessi di rimodellamento della cromatina e di modificazione degli istoni nella regolazione della trascrizione. Esempi.
- Meccanismi di repressione della trascrizione.

- Diverse strategie di regolazione della funzione degli attivatori della trascrizione. Esempi (NF- $\kappa$ B)
- Le principali quattro classi strutturali dei fattori di trascrizione: elica-ansa-elica (omeogeni), elica-giro-elica (Myc/MAX/Mad), Cerniera di leucine (Jun, Fos, CREB, NFAT), dita di zinco (recettori ormoni lipidici). Per ciascuna classe: elementi strutturali e meccanismi di interazione con il DNA, regolazione della funzione, cenni sulla funzione e sui geni regolati)

### ***La maturazione dell'RNA e il controllo post-trascrizionale***

- Significato di del capping e della poliadenilazione dei trascritti. Cenni sui meccanismi di capping, poliadenilazione e terminazione del mRNA.
- Generalità sulla natura discontinua dei geni e significato dello splicing.
- Lo spliceosoma e i meccanismi molecolari dello splicing. Lo splicing alternativo
- Regolazione del riconoscimento dei siti di splicing: le sequenze ESE/ISE e ESS/ISS. Le proteine SR (contenenti i domini RRS) e le proteine hRNPs nella regolazione dello splicing.
- Esempi di patologie causate da mutazioni che deregolano lo splicing.
- Meccanismi di editing del mRNA.
- Cenni sulla regolazione del trasporto e della localizzazione degli mRNA.
- Regolazione della stabilità degli RNA (Esempio delle seq. IRE nella regolazione della stabilità e traduzione degli mRNA per il recettore della Transferrina e della Ferritina).
- I micro-RNA: struttura genica, trascrizione e maturazione, ruolo delle proteine Dicer e Argonata, diversi meccanismi di regolazione dell'espressione genica (trascrizione, stabilità mRNA e traduzione). Natura combinatoriale delle interazioni fra micro-RNA e geni target. Esempi.
- Impatto della scoperta dei microRNA nello studio della funzione dei geni, nei tumori e prospettive cliniche.
- Short-interferingRNAs; utilizzo nella ricerca di base e nella clinica.

### ***Replicazione del DNA***

- meccanismo di replicazione negli eucarioti; Telomeri e problema della replicazione nei telomeri; meccanismo che controlla la replicazione nel ciclo cellulare;

### ***Sistemi di Riparazione del DNA***

- danni al DNA (mutazioni del DNA) e riparazione per escissione delle basi, riparazione per escissione di nucleotidi, riparazione di errori replicativi, riparazione di rotture su entrambi i filamenti.

### ***Regolazione del Ciclo Cellulare***

- Principi generali del controllo del ciclo cellulare.
- Ruolo dei complessi ciclina/Cdk nella progressione del ciclo cellulare.
- Meccanismi molecolari della regolazione delle Cdk: interazione con cicline, fosforilazioni attivatorie e inibitorie, interazione con proteine inibitrici (p121, p16, p27 ecc...). Meccanismi di regolazione delle cicline: trascrizione, ubiquitinazione/degradazione.
- Ruolo dei diversi complessi ciclina/cdk nella progressione delle diverse fasi del ciclo e concetto del "checkpoint".
- Regolazione dei complessi ciclina/Cdk in fase G1 e S: ruolo dell'attivazione di Jun/Fos e Myc e dei principali geni target di Myc; regolazione di E2F1 da Ciclina D/Cdk4, Rb e ciclinaE/Cdk2; regolazione del ciclo cellulare dai soppressori tumorali della famiglia p21, p16, p27 ecc... e loro regolazione da TGFbeta/SMAD e da p53.

### ***Risposta cellulare allo stress***

- La risposta al danno al DNA e i complessi sensori, trasduttori e effettori: ruolo di Atm, Chk1/2, Cdc25 e p53 nella cascata di trasduzione del segnale attivata dal danno al DNA.
- p53: struttura, regolazione (da Mdm2, da Arf e da fosforilazione via Atm/Chk) e funzione nella risposta al danno al DNA, nella senescenza cellulare e nella risposta all'ipossia. Ruolo e meccanismi mediante cui p53 promuove arresto del ciclo cellulare e apoptosi. Significato delle mutazioni di p53 nei tumori.

### ***Apoptosi***

- Significato generale dell'apoptosi nell'omeostasi cellulare.

- Via estrinseca dell'attivazione dell'apoptosi: recettori pro-apoptotici, il death domain (DD) e il death effector domain (DED) e la trasduzione del segnale apoptotico fino all'attivazione delle caspasi regolatorie (caspasi 8).
- Meccanismo di attivazione delle caspasi effettrici (caspasi 3) e ruolo dei loro substrati nel determinare l'apoptosi (cambiamento di forma, frammentazione del DNA, esternalizzazione della fosfatidilserina) e il riconoscimento da cellule con attività fagocitica.
- Via intrinseca dell'attivazione dell'apoptosi: ruolo centrale della regolazione della permeabilità della membrana mitocondriale esterna nel determinare il rilascio di citocromo C, Smac/Diablo e altre proteine che regolano l'apoptosi. Meccanismo di attivazione delle caspasi 9 da parte del citocromo c. Ruolo delle proteine IAP (inibitori di caspasi) nella regolazione dell'apoptosi.
- I diversi meccanismi di regolazione delle 3 principali famiglie di caspasi (caspasi 8, 9 e 3)
- Formazione del poro della membrana mitocondriale esterna: le proteine Bcl2 pro-apoptotiche, le proteine Bcl2 anti-apoptotiche e le proteine BH3-only. Significato funzionale dei domini BH1, BH2 e BH3.
- Regolazione delle proteine BH3 only: ruolo di Bid (substrato di caspasi 8), Bad, Bim ecc... e loro regolazione da p53 e altri stress cellulari.
- L'attivazione di Akt/PKB da fattori di crescita nell'antagonizzare l'apoptosi: ruolo della fosforilazione di Bad, IKK e FOXO3. Significato delle mutazioni di PTEN e della via di PI3K come meccanismo di evasione dall'apoptosi nella tumorigenesi.
- Necrosi: caratteristiche distintive dall'apoptosi

#### ***Manipolazioni genetiche nel topo***

- Transgenesi standard, gene targeting, sistemi Cre-Lox (sistemi costitutivi e inducibili). Esempi di topi transgenici o knock-out generati per lo studio di patologie (malattia di Alzheimer, topo p53<sup>-/-</sup>)

### **Esercitazioni**

Non previste

### **Attività a scelta dello studente**

Non previste

### **Supporti alla didattica in uso alla docenza**

Dispense, materiale didattico, presentazioni in powerpoint delle lezioni ed articoli forniti dal docente

### **Strumenti didattici**

Laboratorio didattico di biologia molecolare

### **Materiali di consumo previsti**

Non previsti

### **Eventuale bibliografia**

Alberts et al. "Biologia Molecolare della Cellula" V ed. Zanichelli  
 Lodish et al. "Biologia molecolare della cellula", IV ed. Zanichelli  
 Lewin "Il gene X", ed. Zanichelli

B. Lewin et al.: Il Gene 2°ed compatta (Zanichelli, 2011)  
Amaldi et al. "Biologia Molecolare", seconda edizione (Ambrosiana)  
Michael M Cox Biologia Molecolare (Zanichelli)

### **Verifica dell'apprendimento**

Prova scritta a domande aperte e verifica orale delle conoscenze e competenze acquisite.